

Trabalho de Conclusão de Curso

Contexto Atual do Desenvolvimento de Dentes em Laboratório

Rubia Venturi



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Rubia Venturi

**CONTEXTO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE
DENTES EM LABORATÓRIO**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso de
Graduação em Odontologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Michelle
Tillmann Biz

Florianópolis

2012

Rubia Venturi

**CONTEXTO ATUAL DO DESENVOLVIMENTO DE
DENTES EM LABORATÓRIO**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do título de cirurgião-dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 15 de outubro de 2012.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Michelle Tillmann Biz
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho a Deus,
que sempre me deu forças a continuar,
apesar de tantos desafios encontrados,
à minha irmã Bruna, que sempre me
incentivou a realizar esse sonho, e ao
meu namorado Igor, que fez os meus
dias ficarem mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por permitir que meu sonho se tornasse realidade. Agradeço pela força que meu deu nos momentos difíceis e nunca ter me deixado desistir.

À minha irmã Bruna, em especial, que sempre me apoiou e acreditou em mim quando decidi seguir meu sonho. Agradeço pelos desabafos que nunca deixou de escutar, por me fazer rir nos momentos difíceis e por me acalmar quando tudo parecia que daria errado. Peço desculpas pelos momentos de ausência que fui obrigada deixar para chegar até aqui. Seu apoio foi fundamental para a realização desse sonho. Dedico essa vitória a você. Obrigada!

À minha irmã Bianca que sempre me incentivou e fez os dias da minha jornada muito importantes e felizes.

À minha sobrinha Louise, que me ensinou a pensar como criança e fez meus dias mais lindos.

À minha mãe, por me apoiar e me dar força nos momentos que achei que não iria conseguir.

Ao meu pai, pelo apoio e incentivo a seguir meu sonho, sem você nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado Igor, que surgiu de forma inesperada na metade do meu caminho, e que sempre me incentivou, me apoiou e acreditou em mim. Agradeço pelos momentos que me escutou quando eu precisava desabafar me ajudou a sanar dúvidas com paciência e sabedoria. Você fez minha jornada ficar mais tranquila e alegre. Obrigada pelo apoio e carinho na execução desse trabalho. Te amo!

À minha prima Naiara que participou dessa jornada desde o início, me apoiou e fez dela mais alegre mesmo nos momentos difíceis.

À minha professora e orientadora, Michelle Tillmann Biz, que acreditou em mim e fez esse trabalho se tornar prazeroso e menos difícil. Agradeço pelo seu esforço, pelos momentos juntas e por você ajudar a fazer esse trabalho se tornar realidade.

Aos meus cunhados Rafael e Rodrigo que sempre me ajudaram e incentivaram ao longo do percurso.

À minha cunhada Raiza e minha sogra que me incentivaram e apoiaram no final desse longo caminho.

Às minhas amigas Raquel e Mari que deram seus ouvidos quando eu precisava desabafar e fizeram os meus dias felizes.

À minha amiga e dupla da clínica, Evelise, agradeço pela companhia nessa longa jornada de trabalho, pelas risadas, pelos ensinamentos e aflições que passamos juntas. Você significou muito para meu crescimento.

Aos meus amigos da faculdade e companheiros de festas, Juliana Trajano, Juliara, Fernanda, Gabriela, Samuel, Richard, agradeço pelos momentos juntos, pelas risadas e por deixarem que essa longa jornada se tornasse mais feliz.

Aos amigos, Henrique, Paula Canever, Roberta Pires Bazzo, Wagner pela ótima companhia e amizade.

Aos amigos Luiz e Batista, que me ajudaram a construir conhecimento no laboratório com muita risada e sabedoria.

Aos professores do cursinho que sempre me incentivaram, ensinaram com sabedoria e deram força para seguir nossos sonhos.

Aos professores da faculdade, Renata, Elisa, Bertoldo, Maibel, Ferrari, que admiro e que me ajudaram a construir conhecimento com sabedoria. Vocês me ensinaram a Odontologia com paciência e amor.

Aos pacientes que acreditaram e confiaram em mim durante as consultas. Sem vocês nada disso seria possível.

Às minhas lindas pacientes, Emily Martins e Esthefany Tchorney,
que mostraram que a Odontologia, além de tudo, deve ser feita com
paciência e muito amor.

...E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.

(1 CORÍNTIOS 13:1-3)

RESUMO

Este trabalho tem por objetivo apresentar uma revisão de literatura sobre o contexto atual do desenvolvimento de germes dentários em laboratório. Para tanto, foram selecionados artigos científicos relevantes sobre o assunto, os quais foram descritos e discutidos em uma linguagem simples, acessível e direta aos profissionais da área da saúde e aos acadêmicos de Odontologia, enfocando quatro aspectos principais: o formato do dente, o local do implante, o desenvolvimento de tecido de suporte e as fontes celulares utilizadas.

Desenvolver uma terceira dentição para substituição de dentes perdidos tem sido um grande enfoque nas pesquisas científicas na área da Odontologia. Entretanto, para que seja possível a formação de um dente, a sequência de eventos biológicos deve ser plenamente compreendida e cada etapa mimetizada. Cada dente possui uma morfologia particular de acordo com a posição e dentição a que pertence, mas o mecanismo de desenvolvimento é similar a todos. Os dentes por interação entre duas fontes celulares, epitélio e ectomesênquima, e a partir dessa interação resultam no órgão dentário completo. Atualmente, existem vários grupos de pesquisadores que buscam a formação de um dente *in vitro*. Para que um dente seja desenvolvido em laboratório é necessário que uma das fontes seja de origem odontogênica do momento da formação. Estas fontes podem ser obtidas de embriões ou de dentes com desenvolvimento tardio em indivíduos pós-nascimento. Para futura aplicação clínica, o ideal seria a utilização de terceiros molares, pois os mesmos possuem o início do desenvolvimento entre os 9 e 19 anos, não esbarrando em questões éticas que envolvem embriões. Alguns trabalhos já utilizam fontes epiteliais e mesenquimais derivados de tecidos adultos: células da medula óssea e papila apical de terceiros molares para o mesênquima; restos epiteliais de Malassez e queratinócitos para o epitélio. Mesmo assim, embora todas as pesquisas demonstrem o desenvolvimento de estruturas dentais, ainda é um grande desafio desenvolver um dente com formato semelhante ao natural. Isso porque a definição da morfologia do dente ocorre através de uma complexa sinalização celular entre epitélio

e ectomesênquima mediada por genes, resultando em no mínimo 16 morfologias diferentes por indivíduo. Outro grande obstáculo é o desenvolvimento de tecidos de suporte, havendo poucas pesquisas científicas que se dedicam a tal fim, e mesmo assim mostrando resultados ainda limitados. Por outro lado, alguns estudos já demonstraram a viabilidade dos maxilares como um leito receptor dos germes a serem implantados. Por fim, a manipulação de tecidos e células em laboratório para a geração de dentes completos é ainda um grande desafio principalmente em relação a forma do dente gerado, tecidos de suporte adequados e fontes celulares convenientes para a aplicabilidade clínica.

Palavras chaves: regeneração, odontogênese, bioengenharia, dente

ABSTRACT

The aim of this study is to present a discussion about the development of tooth in laboratory. The principal articles were selected, described and discussed in an accessible and simple language, focusing in the morphology of the tooth, the implantation, the development of radicular tissue and the cellular sources used.

The possibility of developing a third set of teeth to replace missing teeth has been in focus on Dentistry research. However, for this technology became affordable the biological events should be fully understood and each step of tooth development must be reproduced. Each tooth has a particular morphology according to their position and type of teeth, but development's mechanism is similar to all of them. The teeth develop through interaction of two different cellular sources: epithelium e ectomesenchyme. There are several researches' groups in search for the in vitro tooth development. The major scientific research uses as recombination's sources epithelium and ectomesenchyme. These sources could be isolated from embryos or from teeth with late development from adult individuals. In order to future clinical approach, the third molar should be chosen once it has a late development in individuals with 9 to 19 years old, avoiding the embryos ethical issues. Some researchers have already used epithelium e mesenchyme sources from adult tissues: bone marrow stem cells and third molar's apical papilla (mesenchyme); epithelial rests of Malassez and keratinocytes (epithelium). However, even all these scientific studies had shown the development of dental structures, it is still a great challenge to develop the whole tooth with a usual shape. It is very difficult to develop the natural morphology of the tooth due to the complexity of cellular signaling between the epithelium and ectomesenchyme, which results in 16 different shapes of teeth at least. Another difficulty is the development of cement, periodontal ligament and alveolar bone. There are only a few studies and with limited results. On the other hand, some studies have achieved the maxillaries as a great receptor for the new implant tooth. The manipulation of cells and tissues in order to generate a tooth in laboratory is a great challenge mainly in relation to the shape

of the tooth, the development of root's structures and suitable cellular's sources for future clinical application.

Keywords: regeneration, odontogenesis, bioengineering, tooth

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Fases da Odontogênese em rato.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Dr. / Dra.	Doutor / Doutora
DSPP	Sialofosfoproteína dentinária
LHX7	do inglês <i>LIM homeobox 7</i>
MSX1	do inglês <i>Msh homeobox gene 1</i>
PAX9	do inglês <i>Pared Box gene 9</i>
PGA/PLLA	Poliglicolato/poli-L-lactato
PLGA	Poli-L-lactato-co-glicolato
Prof. / Profa.	Professor / Professora
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
FGF8	Fator de Crescimento de Fibroblastos 8

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 OBJETIVOS.....	28
1.1.1 Objetivo Geral	28
1.1.2 Objetivo Específico	28
2 DESENVOLVIMENTO	31
2.1. Desenvolvimento de Germes Dentários (Odontogênese)	31
2.2. Desenvolvimento de Germes Dentários emLaboratórios	38
2.3. Discussão.....	46
2.3.1 O formato do dente	47
2.3.2 O local do implante	49
2.3.3 O desenvolvimento de tecidos de suporte.....	50
2.3.4 As fontes celulares e as questões éticas envolvidas	52
3 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

Todos os órgãos precisam se desenvolver em locais determinados com exatidão para garantir a funcionalidade do organismo. Na odontogênese, não é diferente. Assim como em outros órgãos ela é regulada por uma série de interações entre tecidos morfológicamente distintos: epitélio e ectomesênquima. Tais interações envolvem três processos fundamentais: o primeiro é o posicionamento, o estímulo necessário para iniciar a formação do órgão no lugar certo – a esse processo, dá-se o nome de iniciação; segundo, células constroem um órgão rudimentar, que servirá como molde ao definitivo – fase chamada de morfogênese – e, finalmente, células formam estruturas órgão-específicas em uma fase dita diferenciação (Peters e Balling, 1999).

Nos mamíferos o dente desenvolve-se a partir do primeiro arco branquial. O primeiro sinal morfológico de desenvolvimento do dente é um espessamento do epitélio oral, o qual demarca o posicionamento para a formação dos dentes. O fator indutor inicial para a formação dos dentes reside no epitélio oral, que começa a proliferar, invadindo o ectomesênquima subjacente e formando, na região onde irão formar-se os arcos dentários, a banda epitelial primária. A partir deste momento o dente irá desenvolver-se como resultado da reciprocidade de interações entre o epitélio oral (derivado do ectoderma) e o ectomesênquima (Kollar e Mina, 1991; Jernvall, Kettunen *et al.*, 1994; Vaahtokari, Aberg *et al.*, 1996; Thesleff e Sharpe, 1997).

Para a formação do dente, processo conhecido como odontogênese, todos os eventos ocorrem de forma sincronizada e coordenada resultando na formação de um órgão dentário completo (Ten

Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004). Para a formação de germes dentários em laboratório cada etapa deste desenvolvimento deve ser mimetizada, a começar pela obtenção de duas fontes de células (ectodermal e mesenquimal) bem como a coordenação para a diferenciação celular, determinação da forma do dente e formação de coroa e raiz.

Atualmente existem diversos grupos de pesquisadores buscando o desenvolvimento de germes dentários completos em laboratório. Para tanto utilizam vários tipos de fontes celulares e técnicas. Um ponto em comum dos trabalhos é que buscam este aprimoramento da produção de dentes em laboratório como um futuro para a Odontologia. Entretanto, frente a tanta inovação científica rápida e termos específicos novos, muitos acadêmicos, cirurgiões dentistas e profissionais da área da saúde se encontram às cegas, sem saber ao certo a viabilidade de tais técnicas para a aplicação clínica futura. Neste sentido, é importante buscar na literatura informação e base para uma discussão, sendo este o principal objetivo deste trabalho de conclusão de curso.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Este trabalho de conclusão de curso tem por objetivo fazer uma revisão de literatura sobre o contexto atual do desenvolvimento de germes dentários em laboratórios.

1.1.2 Objetivos Específicos

São objetivos específicos deste trabalho de conclusão de curso:

- fornecer aos acadêmicos, cirurgiões dentistas e profissionais da saúde uma revisão de literatura atualizada sobre o desenvolvimento de dentes em laboratórios em uma linguagem acessível

- apresentar uma discussão sobre as pesquisas científicas mais relevantes e atuais que buscam o desenvolvimento de dentes em laboratório enfocando questões técnicas e éticas, bem como sua viabilidade para futura aplicação clínica.

2 DESENVOLVIMENTO

A Odontologia atual está vivendo a era da Engenharia de tecidos que utiliza diversas técnicas de recombinação tecidual ou celular para a produção de estruturas dentais isoladas (como dentina e polpa), um dente completo ou ainda outros tecidos do organismo. Este trabalho tem como enfoque os estudos mais relevantes e atuais que utilizam técnicas para o desenvolvimento de germes dentais em laboratório, como uma terceira dentição. Para tanto, foram selecionados os principais artigos científicos sobre o assunto, os quais foram descritos e discutidos em linguagem simples e acessível. Porém, para que tais pesquisas sejam entendidas, se tornem uma tecnologia viável e até mesmo sejam aprimoradas, é necessário conhecer o processo de desenvolvimento normal de um dente para mimetizar esta formação em laboratório. Por este motivo, este trabalho se inicia pelo desenvolvimento de germes dentários *in vivo*, processo conhecido como odontogênese, para seguir então para a discussão das pesquisas científicas atuais de desenvolvimento de dentes em laboratórios.

2.1 Desenvolvimento do germe dentário (Odontogênese)

No embrião humano, a cavidade oral primitiva encontra-se revestida por um epitélio de duas ou três camadas de células que recobrem um tecido conjuntivo primitivo, denominado mesênquima. Este mesênquima que se encontra na face e cavidade oral possui uma origem diferenciada do mesênquima do restante do embrião. Por volta da quarta semana de vida intra-uterina, o mesênquima do crânio e da face é invadido por células da crista neural oriundas da formação do tubo neural. Por este motivo o mesênquima da face é denominado de

ectomesênquima, remontando sua origem ectodérmica, porém que se comporta como um mesênquima, originando, assim, estruturas de natureza conjuntiva (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

Nos mamíferos o dente desenvolve-se a partir do primeiro arco branquial. Os dentes decíduos e permanentes formam-se pela interação entre epitélio oral e ectomesênquima. Cada dente desenvolve-se como estrutura anatômica distinta, portando uma morfologia particular de acordo com a sua posição e a dentição a que pertence, porém o mecanismo de desenvolvimento é similar para todos os dentes (Avery, 2005).

Nos humanos, os dentes decíduos iniciam sua formação por volta da sexta semana de vida intrauterina, e os dentes permanentes por volta da décima semana de vida intrauterina (Bath-Balogh e Fehrenbach, 2006). O fator indutor inicial para sua formação está presente no epitélio oral, o qual começa a proliferar invadindo o ectomesênquima subjacente formando a banda epitelial primária. Estas bandas epiteliais nada mais são do que o espessamento do epitélio oral, resultado do aumento da atividade proliferativa das células epiteliais e da mudança de orientação do plano de clivagem das células em divisão. A banda epitelial primária sofre, quase imediatamente após sua formação, uma bifurcação formando duas populações epiteliais proliferativas paralelas entre si: a lâmina vestibular – que dará origem ao vestíbulo da boca - e a lâmina dentária – que dará origem aos dentes (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

Subseqüentemente ao desenvolvimento da lâmina dentária, inicia-se o processo de odontogênese propriamente dito. O germe

dentário irá desenvolver-se como resultado da reciprocidade de interações entre estes dois tecidos: o epitélio oral e o ectomesênquima. Durante o seu desenvolvimento irá passar por diversas fases as quais são didaticamente organizadas conforme a morfologia do germe dental: fases de botão, capuz, campânula, coroa e raiz (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

A fase de botão representa o início da formação de cada dente, resultado da alta atividade proliferativa das células epiteliais que passam a invadir o ectomesênquima. Esta invasão do epitélio no ectomesênquima ocorre no formato de um botão, que dá nome a esta fase. Embora ocorra uma mudança morfológica do germe dentário, as células epiteliais e ectomesenquimais em proliferação mostram pouca ou nenhuma mudança morfológica ou de função (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004) (Figura 1A-B).

A fase subsequente, de capuz, também é caracterizada por intensa proliferação epitelial e ectomesenquimal. Entretanto, o crescimento da porção epitelial do germe não é uniforme, ocorrendo mais nas laterais, determinando o aparecimento de uma concavidade no centro da porção epitelial no formato de um capuz. Esta porção epitelial forma o órgão do esmalte que possui regiões distintas, a saber: o epitélio externo (convexidade do capuz), o epitélio interno (concavidade do capuz) e o retículo estrelado (células entre o epitélio interno e externo). Já as células ectomesenquimais irão formar duas populações celulares distintas em localização: um grupo de células condensadas abaixo do capuz, formando a papila dentária e um grupo de células ao redor deste capuz, formando o folículo dentário (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004) (Figura 1C-D).

O órgão do esmalte tem origem ectodérmica, enquanto que a papila e o folículo dentário possuem a mesma origem, o ectomesênquima. A papila, o folículo dentário e o órgão do esmalte juntos constituem o germe dentário e serão responsáveis pela formação de dente. O epitélio interno do órgão do esmalte, originará os ameloblastos que secretarão o esmalte; a papila dentária originará os odontoblastos que formarão a dentina e a polpa dentária; o folículo dentário originará os cementoblastos, os fibroblastos e osteoblastos que formarão respectivamente o cimento, o ligamento periodontal e o osso alveolar (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004; Bath-Balogh e Fehrenbach, 2006).

A fase de campânula é denominada de fase de morfo e histodiferenciação pois nesta fase ocorrerá a diferenciação de ameloblastos e odontoblastos que serão responsáveis pela produção de esmalte e dentina, respectivamente. Nesta fase, algumas mudanças na forma do germe dentário ocorrem no epitélio interno do órgão do esmalte determinando, assim, o formato da futura coroa dental. A diferenciação de ameloblastos e odontoblastos iniciará na ponta de cúspide e irá progredir para a cervical num gradiente de diferenciação (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004; Bath-Balogh e Fehrenbach, 2006) (Figura 1E-F).

Para a diferenciação celular o epitélio interno cessa sua atividade mitótica e as células se alongam, tornando-se altas e colunares com núcleo polarizado, são os pré-ameloblastos. Nesse momento, observam-se também mudanças na papila dentária: células ectomesenquimais indiferenciadas aumentam rapidamente de tamanho se diferenciando em odontoblastos que passam a secretar a dentina. As

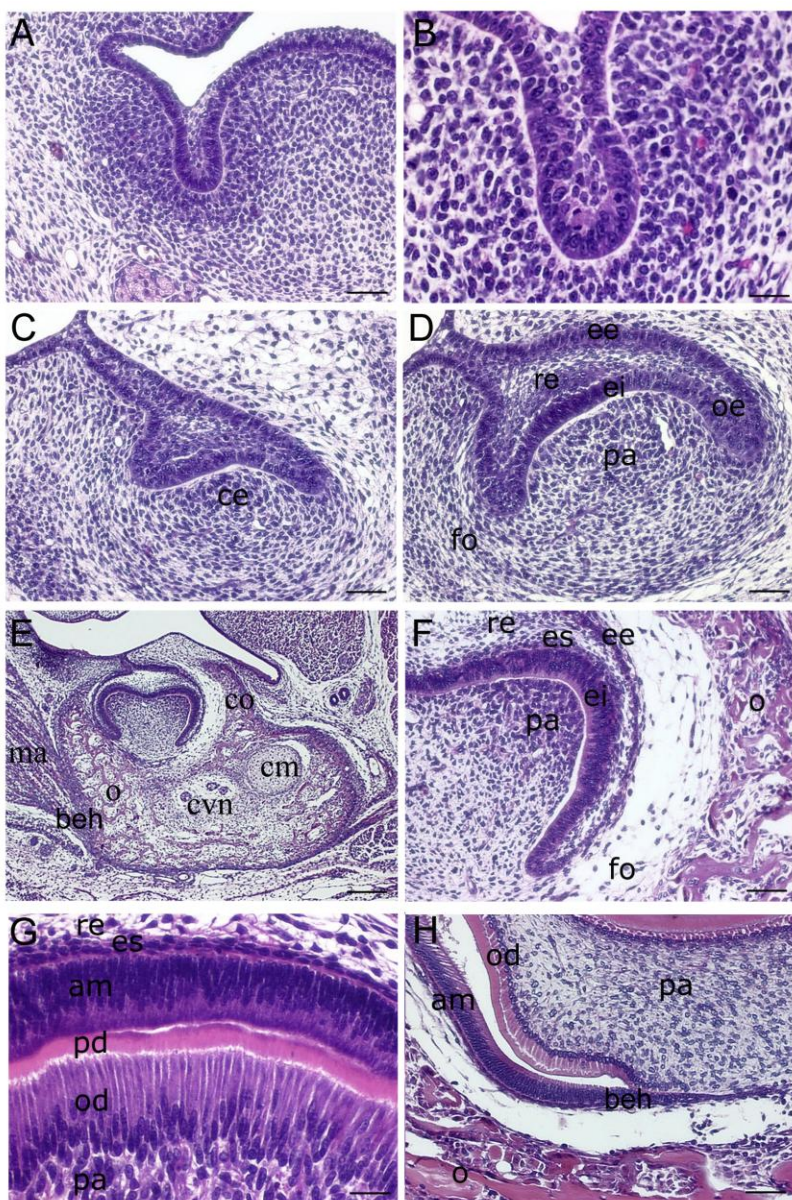
células do epitélio interno irão concluir a sua diferenciação em ameloblastos quando a primeira camada de dentina tiver se formado, secretando então esmalte. Desta forma o germe dentário entra na fase de coroa (Ten Cate, 2001; Avery, 2005).

Na fase de coroa serão formados dois principais tipos de tecidos duros do dente: a dentina e o esmalte. Assim como o gradiente de diferenciação celular, o primeiro local a formar dentina é na ponta da futura cúspide do dente, observando-se estágios cada vez mais avançados de deposição, quanto mais próxima da cúspide for a região examinada. Ameloblastos e odontoblastos passam a sintetizar as suas matrizes em sentidos opostos, sendo o esmalte centrífugo e a dentina centrípeta (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004) (Figura 1G).

Na fase de raiz ocorrerá a formação da dentina radicular e dos tecidos de sustentação do dente: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar. Depois que a coroa está iniciada, os epitélios interno e externo na região cervical do órgão do esmalte proliferam para formar uma dupla camada de células epiteliais denominada bainha epitelial radicular de Hertwig que orientará a formação da raiz (Ten Cate, 2001; Katchburian e Arana-Chavez, 2004) (Figura 1H).

Figura 2.1. Fases da Odontogênese em rato: (A) fase de botão (F15); (B) fase de botão com célula em mitose; (C) início da fase de capuz (F17); (D) fase de capuz (F17); (E) fase de campânula (F19); (F) maior aumento de E mostrando parte da alça cervical em formação; (G) região de ponta de cúspide com detalhe para odontoblastos com pré-dentina, e pré-ameloblastos (fase de diferenciação) e estrato intermediário (D5); (H) alça cervical com odontoblastos e ameloblastos em diferenciação (D5); Barras: (E) 200 μ m; (A), (C), (D), (F) e (G) 50 μ m; (B) e (H) 25 μ m; (C) 12 μ m. Gentilmente cedido por Michelle Tillmann Biz (Biz, 2007).

ce – condensação ectomesenquimal; pa – papila dental; fo – folículo dental; oe – órgão do esmalte; cm – cartilagem de Merckel; cvn – componente vaso nervoso; co – cripta óssea; ma – músculo masseter; ei – epitélio interno; ee – epitélio externo; re – retículo estrelado; o – osso em formação; am – ameloblastos; od – odontoblastos; de – diafragma epitelial; pd – pré-dentina; eo – epitélio oral; e – espaço do esmalte; beh – bainha epitelial de Hertwig



As células da camada interna da bainha epitelial radicular de Hertwig induzem a diferenciação das células ectomesenquimais da papila dental em odontoblastos que secretarão a dentina radicular. As células que induziram a diferenciação dos odontoblastos cessam sua proliferação e secretam uma fina matriz semelhante a composição inicial do esmalte. Devido à contínua formação de dentina radicular e à paralização da divisão das células epiteliais, ocorre a fragmentação de parte da bainha epitelial de Hertwig. As células fragmentadas desta bainha epitelial permanecerão no ligamento periodontal como ilhas de células epiteliais constituindo os restos epiteliais de Malassez (Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

Com a fragmentação da bainha epitelial de Hertwig, há o contato direto das células do folículo dental com a matriz enamelóide. Esse contato induz a diferenciação das células ectomesenquimais em cementoblastos, células que secretam cimento. Nesse mesmo momento, as células foliculares próximas ao osso diferenciam-se em osteoblastos, formando osso alveolar. Já as células do centro, diferenciam-se em fibroblastos e formam o ligamento periodontal (Katchburian e Arana-Chavez, 2004).

2.2 Desenvolvimento de germe dentário em laboratório

Atualmente encontramos na literatura inúmeros trabalhos científicos que objetivam o desenvolvimento de germes dentários em laboratórios. Sabe-se que para o desenvolvimento de dentes completos

necessitamos de duas fontes de células: epitelial e mesenquimal. A fonte de células epiteliais e mesenquimais primeiro utilizada para tal fim foi a odontogênica, proveniente de germes dentários embrionários. Entretanto, alguns pesquisadores já buscam fontes alternativas não-odontogênicas como a medula óssea (para as células mesenquimais) e queratinócitos (para as células epiteliais) ou, se odontogênicas, derivadas de tecidos odontogênicos não embrionários, como os restos epiteliais de Malassez (para as células epiteliais) e a papila de germes de terceiros molares (para as células mesenquimais).

Young e colaboradores (2002) foram um dos grupos pioneiros no desenvolvimento de dentes em laboratórios e no uso de fontes odontogênicas pós-natais. Para desenvolver seu estudo os pesquisadores utilizaram moldes biodegradáveis na forma do dente feitos de poliglicolato/poli-L-lactato (PGA/PLLA) e do poli-L-lactato-co-glicolato (PLGA). Como fonte celular foi utilizado as células provenientes de germes dentais em fase de botão do terceiro molar de porcos aos seis meses de idade. As células epiteliais e mesenquimais foram completamente dissociadas enzimaticamente, cultivadas e posteriormente inseridas nos moldes. O conjunto molde/células foi implantado no omento de ratos imunocomprometidos. Esse ambiente visava criar um bom desenvolvimento celular, visto que possui excelente irrigação sanguínea (Young, Terada *et al.*, 2002).

Em 20 semanas, a análise histológica mostrou a formação de tecido em forma de dente, aparentemente similar a uma pequena coroa dental; dentina mineralizada, pré-dentina, células odontoblásticas, tecido pulpar e tecido extremamente semelhante à bainha epitelial de Hertwig

próximos das pontas radiculares em desenvolvimento. A estrutura desenvolvida trazia semelhança com a cúspide de um terceiro molar de porco, porém, esmalte e ameloblastos só foram observados nos cortes histológicos de 25 semanas. E em 30 semanas, além da camada de dentina circundada por uma fina camada de esmalte foram observados cementoblastos e cimento (Young, Terada *et al.*, 2002).

Em sequência aos seus estudos, este mesmo grupo, liderado por Yelick, repetiu a metodologia anterior, porém utilizando como fonte celular molares de ratos Lewis recém nascidos, com idade entre 3-7 dias, na fase de botão, implantando as mesmas na região de omento de ratos adultos da mesma raça, com idade entre 6 e 12 meses (Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004).

Em 12 semanas a análise histológica demonstrou a presença de dentina, esmalte e tecido pulpar, além de bainha epitelial de Hertwig. Em comparação com o estudo anterior, os pesquisadores verificaram que os germes dentários dos ratos se desenvolveram mais rapidamente (em 12 semanas) em comparação com as células de porco, que levaram em torno de 25 a 30 semanas. Os pesquisadores relacionaram esta diferença à maturação natural característica de cada espécie, visto que o terceiro molar do porco leva 80 semanas para irromper, enquanto o primeiro molar dos ratos irrompe após 7 semanas, tendo este um desenvolvimento mais acelerado (Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004).

Este grupo de pesquisadores ainda buscou verificar, em estudo subsequente, sem a utilização de moldes biodegradáveis, a possibilidade de desenvolvimento do germe dentário nos maxilares. Para isso coletaram células de germes dentários na fase de botão de ratos Lewis de 4 dias, dissociaram-nas e implantaram-nas no alvéolo de um primeiro

molar inferior de ratos Lewis adultos. A análise histológica revelou a presença de dentina e pré-dentina, esmalte não mineralizado e mineralizado e osso alveolar, porém não tão organizados quanto no estudo anterior. Entretanto, os autores ressaltam que embora os tecidos não sejam tão organizados houve o crescimento de estruturas bem diferenciadas, exibindo características morfológicas e histológicas com aparência típica de dentina e esmalte formados no desenvolvimento natural (Young, Terada *et al.*, 2002; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2008).

Já Ohazama e colaboradores (2004) buscaram obter fontes alternativas não odontogênicas para as células mesenquimais: células tronco embrionárias de ratos, células tronco da medula espinhal de embriões de ratos e células da medula óssea da tíbia e fêmur de ratos adultos. Porém, a fonte epitelial foi retirada do epitélio odontogênico da mandíbula de embriões de ratos. Cada grupo de células mesenquimais foi agregado em uma massa sólida e recoberto pelo epitélio odontogênico, cultivadas *in vitro* por 3 dias e analisadas para a expressão de marcadores moleculares de desenvolvimento dental. Os três tipos celulares expressaram identicamente os marcadores moleculares envolvidos na odontogênese (MSX1, LHX7, PAX9) (Ohazama, Modino *et al.*, 2004).

Na sequência, implantaram as três recombinações obtidas abaixo da cápsula renal de ratos adultos por 10 a 14 dias. Nos três tipos diferentes de recombinação houve a formação de osso e tecido mole, porém, somente nas amostras de recombinações celulares de células de medula óssea com o epitélio odontogênico houve formação de uma estrutura dentária contendo esmalte, dentina, polpa, com suas

respectivas células diferenciadas, estando esta estrutura cercada por osso e tecido mole. Embora as recombinações derivadas de células tronco embrionárias e tecido neural não resultarem em estruturas dentárias, houve a expressão gênica de DSPP, um gene expresso em odontoblastos, indicando que houve diferenciação celular (Ohazama, Modino *et al.*, 2004).

HU e colaboradores (2005) utilizaram o primeiro molar inferior de embriões de rato com 14 dias de desenvolvimento, na fase de capuz. Os pesquisadores seguiram dois padrões de recombinação das células coletadas: tecido mesenquimal intacto com células epiteliais dissociadas e células mesenquimal dissociadas com células epiteliais dissociadas. As associações teciduais foram cultivadas em placas de cultura contendo meio semissólido com trocas de meio de cultura frequente. Em análise histológica, 12 dias após, foi possível verificar que ambas as culturas formaram tecido dental bem diferenciado, porém, na recombinação em que o tecido mesenquimal foi mantido intacto observou-se um desenvolvimento do tecido dental mais precocemente (Hu, Nadiri *et al.*, 2005)

Seguindo esta linha, o mesmo grupo de pesquisadores em 2006 reproduziu o estudo anterior, porém, adicionou ao seu experimento um terceiro grupo de recombinação: tecido epitelial intacto com células mesenquimais dissociadas. As recombinações foram, após atingir o estágio de campânula foram implatadas abaixo da pele na região auricular de ratos adultos por 2 semanas. Apesar de em todas as combinações ter ocorrido diferenciação de ameloblastos, odontoblastos, formação de raiz e ligamento periodontal, novamente apenas na recombinação em que o tecido mesenquimal permaneceu intacto houve

correto desenvolvimento morfológico do dente, com número de cúspides e forma da coroa similar ao primeiro molar inferior de rato (Hu, Nadiri *et al.*, 2006).

Também utilizando a técnica da recombinação tecidual, Shinmura e colaboradores (2008), buscou desenvolver um germe dentário utilizando como fonte epitelial os restos epiteliais de Malassez, fonte de células epiteliais odontogênicas, porém não embrionária. Os pesquisadores embasam sua escolha na teoria de que os restos epiteliais de Malassez, por derivarem de linhagem celular do epitélio de Hertwig (formadora do esmalte *in vivo*), guardariam a memória celular e a capacidade de se diferenciar em ameloblastos em situações controladas (Shinmura, Tsuchiya *et al.*, 2008).

Para tanto, os pesquisadores isolaram os restos epiteliais de Malassez de um incisivo inferior de porco. Estes foram recombinados com células ectomesenquimais retiradas de germes dentários do terceiro molar na fase de botão de porcos de seis meses de idade (fonte odontogênica, porém não embrionária). O resultado do cultivo foi semeado em moldes de colágeno extraído de pele de porco, e implantado na região de omento de ratos imunocomprometidos com idade entre 5 e 7 semanas. Os implantes foram analisados entre 2 e 8 semanas de cultivo *in vivo*. Em todos os moldes, análises histológicas mostraram o desenvolvimento de estruturas dentais na fase de amelogênese e dentinogênese. Embora os implantes não tenham atingido uma estrutura dental em seu formato habitual (Shinmura, Tsuchiya *et al.*, 2008).

Em 2009, um grupo de pesquisadores buscou uma técnica da recombinação tecidual para o desenvolvimento de tecidos dentais

utilizando fontes odontogênicas, porém com um fator de inovação: os germes obtidos foram implantados na cavidade bucal de um rato adulto. Para isso, os pesquisadores utilizaram germes molares de ratos com 14 dias de formação embrionária dissociando os tecidos epiteliais e mesenquimais e cultivaram *in vitro* sua recombinação. Entre 5 e 7 dias, um germe dental de molar se desenvolveu até o estágio inicial de campânula, que foi transplantado para o osso alveolar na região do primeiro molar superior de ratos adultos. Após 37 dias houve erupção de cúspides na cavidade oral. A dimensão vertical da coroa continuou a crescer, até que os dentes atingiram o plano de oclusão com oposição adequada ao primeiro molar inferior, com 50 dias de transplante. Houve desenvolvimento de espaço periodontal adequado e o dente neoformado mostrou-se funcional. Houve formação de ameloblastos, esmalte, odontoblastos, dentina, vasos sanguíneos, polpa e osso alveolar. Através do teste de Knoop, foi demonstrado que a dureza da dentina e do esmalte apresentavam-se normais. O ligamento periodontal e o osso alveolar responderam de forma positiva à movimentação ortodôntica e neurônios na polpa e ligamento periodontal forma responsivos a estimulação. Apesar de possuir todos os componentes funcionais, o dente manipulado era menor que os dentes normais, sem adequada largura da coroa, posição das cúspides e posicionamento anterior/posterior e lingual/vestibular (Ikeda, Morita *et al.*, 2009).

Em 2010, um estudo de Wang e colaboradores propôs uma nova abordagem para o desenvolvimento de um dente, usando queratinócitos humanos como fonte epitelial (fonte não odontogênica), tendo como base o potencial de diferenciação dos queratinócitos humanos e a facilidade de obtenção do material para cultura. Os

pesquisadores cultivaram células da camada basal da pele do prepúcio de crianças que foram circuncidadas entre 5 e 12 anos de idade e realizaram a recombinação com células mesenquimais de germes de molares de embriões de ratos (fonte odontogênica embrionária). A recombinação, o tecido foi cultivado abaixo da cápsula renal de roedores imunocomprometidos por 4 semanas (Wang, Li *et al.*, 2010).

Após análise histológica e imuno-histoquímica, constatou-se o desenvolvimento de estrutura semelhante a coroa (com odontoblastos e dentina), porém, sem a formação de esmalte. O tecido em questão possuía marcadores epiteliais humanos (no epitélio) e marcadores mesenquimais de ratos (nos tecidos derivados do mesênquima), demonstrando a formação de um dente quimérico. Em sequência aos experimentos, os pesquisadores adicionaram ao meio de cultura o fator de crescimento FGF8, com a intenção de estimular os queratinócitos a diferenciarem-se em ameloblastos. Desta forma, obtiveram uma estrutura semelhante a um dente contendo dentina, esmalte e polpa, bem como suas células diferenciadas, odontoblastos e ameloblastos (Wang, Li *et al.*, 2010).

Outra abordagem para o desenvolvimento de dentes que é utilizada por alguns pesquisadores é a utilização somente de fontes de células mesenquimais para o desenvolvimento de dentina (coronária e radicular) e tecidos de suporte, onde posteriormente pode-se realizar a colocação de uma coroa protética para fins estéticos e funcionais (Sonoyama, Liu *et al.*, 2006).

Nesta linha de pensamento, Sonoyama e colaboradores (2006) buscaram explorar o potencial da reconstrução de um dente funcional tendo como fonte mesenquimal as células tronco da papila apical de

incisivos inferiores de minipigs. Para tanto, as células foram coletadas, isoladas, combinadas com hidroxiapatita e tricálcio fosfato e implantadas no sítio de extração de um incisivo inferior de um minipig, de forma autóloga. Após 3 meses, notou-se o surgimento de estruturas similares à raiz e ligamento periodontal, em que foi possível a colocação de uma coroa de porcelana. A estrutura da raiz do dente neoformado nos minipigs apresentou menor resistência à força de compressão em comparação com dentes naturais, mas, mantiveram-se funcionais após receber uma coroa de porcelana (Sonoyama, Liu *et al.*, 2006).

2.3 Discussão

Este trabalho teve por objetivo a revisão atual sobre o desenvolvimento de germes dentários em laboratório. Para tanto, iniciou-se fazendo uma breve revisão de literatura sobre o desenvolvimento de germes dentários *in situ* (Odontogênese) para que se possa entender o processo de desenvolvimento habitual.

Para se desenvolver um germe dentário completo em laboratório alguns requisitos mínimos devem ser respeitados, buscando-se sempre mimetizar o desenvolvimento normal de um dente. Deve-se ter duas fontes celulares distintas, epitelial e mesenquimal, uma vez que o desenvolvimento do dente ocorre por meio de uma interação entre esses dois tipos celulares. Além disso, é necessário um ambiente favorável para o desenvolvimento deste germe quando as células são colocadas em contato para interagirem, como um meio ricamente vascularizado que possa suprir as células de suas necessidades de nutrição.

Atualmente existem vários grupos de pesquisadores buscando o desenvolvimento de germes dentários em laboratório utilizando para tanto diversas fontes celulares e técnicas de regeneração de uma possível terceira dentição. Sendo assim, as pesquisas científicas que visam recriar um dente completo em laboratório merecem ser discutidas levando em consideração alguns parâmetros primordiais: o formato do dente, o local do implante, o desenvolvimento de tecidos de suporte, e, por fim, as fontes celulares e as questões éticas envolvidas.

2.3.1 O formato do dente

A maioria dos pesquisadores que desejam desenvolver um dente utilizam a técnica da recombinação tecidual. Embora muitos pesquisadores tenham conseguido a formação de uma coroa dental completa o formato deste dente está longe ainda de ser o ideal (Young, Terada *et al.*, 2002; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004; Ohazama, Modino *et al.*, 2004; Hu, Nadiri *et al.*, 2005; Hu, Nadiri *et al.*, 2006; Sonoyama, Liu *et al.*, 2006; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2008; Shinmura, Tsuchiya *et al.*, 2008; Ikeda, Morita *et al.*, 2009; Wang, Li *et al.*, 2010)

Desenvolver um dente com um formato pré-concebido utilizando a técnica da recombinação de tecidos tem demonstrado ser um grande desafio. Isso porque a definição do formato dos dentes é resultado de uma complexa e dinâmica sinalização celular entre epitélio e ectomesênquima, mediada por genes. De uma forma simplificada é como um sistema do tipo interruptor, onde diferentes combinações de inúmeros genes “ligados” ou “desligados” resultariam na formação de dentes com formatos, posições e número específicos (Kollar e Baird, 1969; Mackenzie, Ferguson *et al.*, 1992; Sharpe, 1995; Thomas, Tucker

et al., 1997; Ohazama, Courtney *et al.*, 2004). Daltoé e colaboradores (2010) ressaltam esta dificuldade encontrada pelos pesquisadores, pois além de existir quatro grupos dentais (incisivos, caninos, pré-molares e molares), há ainda as diferenças em relação aos quatro hemiarcos (mandíbula/maxila; direita/esquerda) e as características de cada indivíduo. Sendo assim, temos 16 morfologias diferentes por indivíduo no mínimo a ser alcançada (Daltoé, Miguita *et al.*, 2010).

Sabe-se também que a papila dental possui grande influência na determinação da forma do dente. Um trabalho clássico de Kollar e Baird (1969) buscou entender este processo. Para tanto fez recombinações teciduais: recombinau papila de molar com epitélio odontogênico de incisivo e vice-versa. Para surpresa o epitélio odontogênico de incisivo adaptou-se a papila dental do molar e o dente formado adquiriu o formato de molar, demonstrando que a papila dental possui papel fundamental no processo de definição de forma do dente (Kollar e Baird, 1969). No trabalho de Hu e colaboradores (2005 e 2006) também ficou evidente a importância do ectomesênquima na determinação da forma do dente: quando realizaram recombinação tecidual entre células epiteliais dissociadas e ectomesênquima intacto o resultado foi melhor do que entre células epiteliais dissociadas e ectomesênquima dissociado: houve um melhor controle do número de cúspides e forma da coroa similar ao dente de origem dos tecidos (Hu, Nadiri *et al.*, 2005; Hu, Nadiri *et al.*, 2006).

Ainda na tentativa de alcançar o formato do dente, alguns pesquisadores buscaram utilizar na suas recombinações teciduais arcabouços (moldes) no formato de um dente, objetivando que as células respeitem o formato do molde e o utilizem como guia (Young, Terada *et*

al., 2002; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004). Entretanto, o que se pode observar nos resultados relatados pelos pesquisadores é que a estrutura dental formada após a diferenciação celular de ameloblastos e odontoblastos não apresentou o formato anatômico semelhante ao dente usual, mesmo com a utilização do arcação. Isso significa que a utilização do molde prévio no formato do dente que se deseja não garante o desenvolvimento do dente no formato esperado. Ao que parece os moldes proporcionam um modelo estático de desenvolvimento não acompanhando a dinâmica complexa do desenvolvimento do dente como *in situ*. Neste sentido, alcançar o formato ideal de um dente ainda é um grande obstáculo a ser superado pelos pesquisadores.

2.3.2 O local do implante

Em relação ao local do implante, encontramos na literatura locais apropriados tecnicamente para o desenvolvimento dos germes dentários: omento, cápsula renal e alvéolo dentário. Embora o omento e a cápsula renal tenham sido locais propícios, é claro que o mais desejável seria o próprio local para o qual o dente está sendo desenvolvido, ou seja, o alvéolo dentário. E neste ponto alguns pesquisadores obtiveram sucesso em seus experimentos.

No ano de 2004, Ohazama e colaboradores objetivando avaliar se os maxilares de um rato adulto poderiam ser um local para o desenvolvimento de um germe dentário, realizaram o implante de um germe de molar de ratos na fase de capuz na região de diastemas de um rato adulto. A análise histológica demonstrou que o germe desenvolveu-se normalmente, integrando-se perfeitamente ao novo ambiente (Ohazama, Modino *et al.*, 2004). Embora não tenham usado

recombinações teciduais (apenas um germe dissecado) este trabalho foi pioneiro em demonstrar que um germe dentário implantado poderia desenvolver-se na mandíbula de um rato adulto.

Seguindo este mesmo princípio, nos anos que se seguiram vários pesquisadores implantaram as suas recombinações teciduais nos maxilares. Sonoyama e colaboradores (2006) implantaram suas recombinações no sítio de extração de um incisivo inferior de minipigs (Sonoyama, Liu *et al.*, 2006). Já Duailibi e colaboradores (2008) e Ikeda e colaboradores (2009) implantaram a sua recombinação no alvéolo de primeiros molares inferiores de ratos após a extração (Duailibi, Duailibi *et al.*, 2008; Ikeda, Morita *et al.*, 2009). Todos estes trabalhos demonstraram que os maxilares de animais adultos representam um local adequado para o desenvolvimento de germes de dentes implantados para regeneração, abrindo uma perspectiva mais favorável no que diz respeito à ideia de se desenvolver novos dentes clinicamente.

2.3.3 O desenvolvimento de tecidos de suporte

Outro grande desafio enfrentado pelos pesquisadores é o desenvolvimento dos tecidos de suporte dos dentes (cimento, ligamento periodontal e osso alveolar). Até o ano de 2006, os pesquisadores não tinham alcançado o desenvolvimento destas estruturas, somente apresentavam seus resultados em relação aos tecidos coronários (dentina, esmalte, polpa e suas células). Talvez este fato esteja relacionado com o tempo de observação do implante, já que a maioria analisava os tecidos derivados do implante antes do tempo adequado para a formação dos tecidos de sustentação.

Porém, alguns pesquisadores objetivaram também o desenvolvimento de estruturas de suporte. Hu e colaboradores (2006) alcançaram o desenvolvimento de primórdios de raiz com ligamento periodontal a partir da recombinação de epitélio e ectomesênquima de germes de ratos na fase de capuz, cultivados em meio semi-sólido em laboratório, sem haver o implante em um animal adulto.

No mesmo ano Sonoyama e colaboradores (2006) conseguiram desenvolver tecidos de sustentação a partir da combinação de células tronco do tecido apical de minipigs com hidroxiapatita e tricálcio fosfato que foi implantada no sítio de extração de um incisivo inferior de um minipig. Em 3 meses **a estrutura radicular desenvolveu-se contendo ligamento periodontal**. Embora tenha sido formado um dente parcial (coroa com dentina, polpa, e tecidos de sustentação) com menor resistência à força de compressão em comparação com dentes naturais, os pesquisadores puderam realizar nesta raiz a colocação de uma coroa de porcelana, colocando o dente em função (Sonoyama, Liu *et al.*, 2006).

Em 2009, Ikeda e colaboradores desenvolveram um dente no osso alveolar da região do primeiro molar superior de ratos a partir da recombinação tecido epitelial e mesenquimal de germes dentários de embriões de ratos. Em 37 dias houve erupção de cúspides na cavidade oral e aos 50 dias o dente atingiu o plano de oclusão, ocorrendo o desenvolvimento de espaço periodontal adequado e o dente neoformado mostrou-se completamente funcional com resistência quanto às forças mastigatórias similares aos dentes naturais. Entretanto, embora o dente tenha desenvolvido todas as estruturas dentais era menor do que o usual (Ikeda, Morita *et al.*, 2009).

Desta forma, pela técnica da recombinação tecidual estes grupos de pesquisadores conseguiram reproduzir um biodente com os tecidos dentais de suporte, demonstrando que é possível alcançar a formação de um dente completo, resguardadas as limitações atuais das técnicas, como o formato do dente e as fontes celulares utilizadas.

2.3.4 As fontes celulares e as questões éticas envolvidas

Como visto anteriormente, para o desenvolvimento de germes dentários em laboratório é necessário a combinação de duas fontes de células diferentes: epitelial e mesenquimal. Nesta recombinação tecidual, ao menos uma das fontes celulares utilizadas deve ser odontogênica proveniente do momento da formação do dente, uma vez que contém células que estão comprometidas com a sinalização necessária para o desenvolvimento do dente. Esta fonte, seja epitelial ou mesenquimal, é obtida de germes ainda em desenvolvimento, podendo ser a partir de embriões, ou de germes dentários em formação em indivíduos adultos.

Foi utilizando a recombinação de epitélio e mesênquima de germes dentários de embriões de ratos que Hu e colaboradores (2005 e 2006) e Ikeda e colaboradores (2009) conseguiram desenvolver estruturas dentais. Hu e colaboradores, em seus trabalhos em 2005 e 2006, também tiveram dificuldades na obtenção de um germe dentário com um formato usual, porém seus resultados reforçam a importância do ectomesênquima intacto na determinação da forma do dente (Hu, Nadiri *et al.*, 2005; Hu, Nadiri *et al.*, 2006). Já Ikeda e colaboradores (2009) demonstraram que estas células recombinadas podem ser

implantadas nos maxilares de adultos, onde recebem um meio adequado de nutrição para a diferenciação celular e secreção de matriz (Ikeda, Morita *et al.*, 2009).

Entretanto, uma vez que se tenha uma fonte celular odontogênica comprometida com a formação do dente, a outra fonte celular utilizada poderá ser uma fonte alternativa não odontogênica (de outras regiões do corpo que não o dente), ou, se odontogênicas, derivadas de tecidos odontogênicos adultos (dentes já formados). Ohazama e colaboradores (2004) obtiveram sucesso no desenvolvimento de um dente com a recombinação de células da medula óssea de ratos adultos com epitélio odontogênico embrionário de rato (Ohazama, Modino *et al.*, 2004). E Wang e colaboradores (2010) obtiveram sucesso ao recombinar queratinócitos humanos, como fonte epitelial não odontogênica, com células mesenquimais de germes de molares de embriões de ratos (fonte odontogênica embrionária) (Wang, Li *et al.*, 2010). Nestes dois casos o desenvolvimento do dente foi possível mesmo com uma das fontes não odontogênica, pois a outra fonte utilizada possui um comprometimento com a formação do dente e comanda a sinalização e a formação dos tecidos dentários.

Se pensarmos na possibilidade de transpor estas pesquisas para uma futura aplicação clínica com a utilização de células humanas, a fonte embrionária estaria fora de cogitação, por questões éticas já há muito discutidas pela comunidade científica. Entretanto, haveria a possibilidade de utilizarmos os germes dos terceiros molares, que possuem um desenvolvimento tardio e encontram-se na fase inicial de botão no indivíduo pós-nascimento (Duailibi, Duailibi *et al.*, 2011).

Foi pensando nesta possibilidade de utilização de fontes pós-natais, que facilitariam a aplicação clínica sem esbarrar nas questões éticas que envolvem embriões, que pesquisadores passaram a desenvolver seus estudos. Young e colaboradores (2002) utilizaram germes de terceiros molares de porcos, enquanto Duailibi e colaboradores (2004 e 2008) obtiveram estruturas dentais utilizando como fonte germes dentários provenientes de molares de ratos após o nascimento. Nestes estudos, embora o germe dentário possua limitações anatômicas, as células utilizadas demonstraram uma competência em reconhecer-se, mesmo após dissociação, sendo capazes de se reorganizarem, diferenciarem-se e secretarem os tecidos mineralizados do dente (esmalte e dentina) (Young, Terada *et al.*, 2002; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2004; Duailibi, Duailibi *et al.*, 2008), trazendo muitos benefícios para o entendimento do processo de desenvolvimento dos germes dentários.

Mais inovador é o estudo de Shinmura e colaboradores (2008). Os autores obtiveram sucesso na produção de um dente a partir da combinação de duas fontes odontogênicas, porém não embrionárias: restos epiteliais de Malassez de porcos e células da papila de germes de terceiros molares de porcos (Shinmura, Tsuchiya *et al.*, 2008). Os restos epiteliais de Malassez são resquícios da bainha epitelial de Hertwig fragmentada e que permanece no ligamento periodontal (Ten Cate, 2001). Por conterem células com a mesma origem dos ameloblastos (o epitélio interno do órgão do esmalte), possuem esta capacidade de diferenciação, demonstrado por Shinmura e colaboradores (2008) (Shinmura, Tsuchiya *et al.*, 2008), podendo ser facilmente isoladas de dentes humanos extraídos.

Poderíamos pensar que os estudos de Young e colaboradores (2002), Duailibi e colaboradores (2004 e 2008) e Shimura e colaboradores (2008) estão mais próximos da realidade clínica, pois utilizaram germes dentários de molares de indivíduos pós-nascimento, sendo o terceiro molar o dente mais indicado. Nesta linha de pensamento, Duailibi e colaboradores (2011) desenvolveram um estudo em humanos que realizou uma correlação entre estágio radiográfico de desenvolvimento dos terceiros molares e potencial das células da papila dental destes dentes para utilização em terapias regenerativas. Numa classificação de estágios de 1 a 6 (conforme o desenvolvimento dental), verificaram que o melhor estágio é o 1 (até a coroa formada). Este estágio foi encontrado em indivíduos entre as idades de 9 e 19 anos (Duailibi, Duailibi *et al.*, 2011), demonstrando a sua viabilidade como fonte de células.

Sonoyama e colaboradores em 2006 já relatavam em seu trabalho a viabilidade de uso das células da papila apical de terceiros molares: o potencial de diferenciação destas células se mostrou similar ao de outras fontes mesenquimais, como polpa dental e medula óssea. Da mesma forma, demonstraram que quando comparadas as células tronco da polpa dental, as células derivadas da papila apical se mostraram mais efetivas na formação de dentes, por apresentarem maior atividade mitótica e capacidade de diferenciação (Sonoyama, Liu *et al.*, 2006).

Pensar nos terceiros molares como uma fonte de células foi um grande avanço nas pesquisas para desenvolvimento de dentes em laboratório. As células poderiam ser utilizadas para o benefício do próprio indivíduo (autógeno), mas também não estaria descartada a

possibilidade do transplante alogênicos, para indivíduos que não possuem mais o terceiro molar. Caso a utilização desta técnica se mostre viável, há necessidade de estudos adicionais no que tange à imunogenicidade desta abordagem.

3 CONCLUSÃO

Muitos pesquisadores se dedicam ao desenvolvimento de dentes em laboratório, porém os desafios a serem enfrentados ainda são muitos. Embora tenham alcançado a formação de estruturas dentais, o formato do dente está longe de ser o ideal. Neste sentido, utilizar biomoldes em formatos prévios parece não auxiliar. Resta apenas conhecer e dominar a sinalização entre epitélio e ectomesênquima na determinação da forma do dente e buscar fontes celulares capazes de reproduzir estas informações para gerar um dente com formato pré-concebido.

Em relação ao local do implante, os maxilares parecem ser um local adequado, com a nutrição necessária para o desenvolvimento de dentes, e capaz de conectar-se aos novos tecidos gerados por meio das recombinações.

Além da morfologia, é necessário alcançar um elemento dental funcional. Apesar da grande dificuldade, pesquisadores conseguiram reproduzir um biodente, com os tecidos dentais de suporte, demonstrando que é possível alcançar a formação de um dente completo. Porém, há a necessidade de aprimorar a sua forma, tamanho e os próprios tecidos de suporte para que possam suportar as forças habituais da mastigação.

Por fim, a barreira das fontes celulares utilizadas alcançou um grande avanço recentemente. Um dos grandes obstáculos superados foi a busca por alternativas de fontes epiteliais e mesenquimais adultas, visto que não envolvem questões éticas a respeito da utilização de embriões. Pesquisas indicam que queratinócitos humanos e as células da medula óssea podem ser usadas como fontes epiteliais e mesenquimais não odontogênicas, respectivamente. Outros estudos nos levaram a

reconhecer a possibilidade de usar tecidos odontogênicos adultos como restos epiteliais de Malassez para fonte epitelial. Por outro lado, a fonte odontogênica em formação necessária para o comando da sinalização e o desenvolvimento do dente poderá ser oriunda de terceiros molares em formação, visto que possuem desenvolvimento tardio em humanos, sendo uma fonte celular acessível e adequada.

Mesmo com tantos obstáculos para alcançar um dente com morfologia adequada e funcional, as pesquisas já evoluíram muito. Todos os estudos contribuem de forma significativa, pois resultam em conhecimento aprofundado sobre os mecanismos de desenvolvimento dentário e as melhores fontes celulares e recombinações, o que certamente contribuirá para a superação das dificuldades atuais e para uma futura aplicação clínica.

REFERÊNCIAS

- AVERY, J. K. **Desenvolvimento e Histologia Bucal**. Porto alegre: Artmed, 2005. 456.
- BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. **Dental Embriology, Histology and Anatomy**. Saint Louis: Elsevier Saunders, 2006. 403.
- BIZ, M. T. **Distribuição, expressão e papel das GTPases RhoA e Rac1 nas fases iniciais do desenvolvimento do germe dentário e na diferenciação de amloblastos e odontoblastos**. 2007. 119 (doutorado). Biologia Celular e do Desenvolvimento, Universidade de São Paulo
- DALTOÉ, F. P.; MIGUITA, L.; MANTESSO, A. Terceira dentição: uma visão geral do seu desenvolvimento. **Revista Gaúcha de Odontologia (RGO)**, v. 58, n. 3, p. 387-392, 2010.
- DUALIBI, M. T. et al. Tooth tissue engineering: optimal dental stem cell harvest based on tooth development. **Artif Organs**, v. 35, n. 7, p. E129-35, Jul 2011. ISSN 1525-1594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21702761> >.
- _____. Bioengineered teeth from cultured rat tooth bud cells. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 523-8, Jul 2004. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218040> >.
- DUALIBI, S. E. et al. Bioengineered dental tissues grown in the rat jaw. **J Dent Res**, v. 87, n. 8, p. 745-50, Aug 2008. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18650546> >.
- HU, B. et al. Dental Epithelial histo-morphogenesis in the mouse: positional information versus cell history. **Arch Oral Biol**, v. 50, n. 2, p. 131-136, Feb 2005.
- _____. Tissue engineering of tooth crown, root, and periodontium. **Tissue Eng**, v. 12, n. 8, p. 2069-75, Aug 2006. ISSN 1076-3279. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968149> >.
- IKEDA, E. et al. Fully functional bioengineered tooth replacement as an organ replacement therapy. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 32, p. 13475-80, Aug 2009. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19666587> >.
- JERNVALL, J. et al. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. **Int J Dev Biol**, v. 38, n. 3, p. 463-469, Sept 1994.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V. **Histologia e Embriologia Oral**. 2. São Paulo: Panamericana, 2004. 372.

KOLLAR, E.; MINA, M. Role of the early epithelium in the patterning of the teeth and Merckel's cartilage. **J Craniofac Genet Dev Biol**, v. 11, n. 4, p. 223-228, Oct-Dec 1991.

KOLLAR, E. J.; BAIRD, G. R. The influence of the dental papilla on the development of the tooth shape in embryonic mouse tooth germs. **J Embryol Exp Morph**, v. 21, n. 1, p. 131-148, Fev 1969.

MACKENZIE, A.; FERGUSON, M. W.; SHARPE, P. T. Expression patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. **Development**, v. 115, n. 2, p. 403-20, Jun 1992. ISSN 0950-1991. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1358591> >.

OHASAMA, A. et al. Traf6 is essential for murine tooth cusp morphogenesis. **Dev Dyn**, v. 229, n. 1, p. 131-5, Jan 2004. ISSN 1058-8388. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14699584> >.

_____. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. **J Dent Res**, v. 83, n. 7, p. 518-22, Jul 2004. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15218039> >.

PETERS, H.; BALLING, R. Teeth. Where and how to make them. **Trends Genet**, v. 15, n. 2, p. 59-65, Feb 1999. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098408> >.

SHARPE, P. T. Homeobox genes and orofacial development. **Connect Tissue Res**, v. 32, n. 1-4, p. 17-25., 1995.

SHINMURA, Y. et al. Quiescent epithelial cell rests of Malassez can differentiate into ameloblast-like cells. **J Cell Physiol**, v. 217, n. 3, p. 728-38, Dec 2008. ISSN 1097-4652. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18663726> >.

SONOYAMA, W. et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine. **PLoS ONE**, v. 1, p. 79, 2006.

TEN CATE, R. **Histologia Bucal. Desenvolvimento, Estrutura e Função**. 5. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 497.

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signalling networks regulating dental development. **Mech Dev**, v. 67, n. 2, p. 111-123, Out 1997. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T9H-3RJXB1T-1/2/1c60f44f09a70eda4a88a84659426307> >.

THOMAS, B. L. et al. Role of Dlx-1 and Dlx-2 genes in patterning of the murine dentition. **Development**, v. 124, n. 23, p. 4811-4818, December 1 1997. Disponível em: < <http://dev.biologists.org/cgi/content/abstract/124/23/4811> >.

VAAHTOKARI, A. et al. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. **Mech Dev**, v. 54, n. 1, p. 39-43, Jan 1996. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T9H-3VXJ91P-3/2/7af795fe37be6ca8575e0a414fff107e> >.

WANG, B. et al. Induction of human keratinocytes into enamel-secreting ameloblasts. **Dev Biol**, v. 344, n. 2, p. 795-9, Aug 2010. ISSN 1095-564X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20678978> >.

YOUNG, C. S. et al. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. **J Dent Res**, v. 81, n. 10, p. 695-700, Oct 2002. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12351668> >.